

BASE MATERIAL FOR CULTURING CARTILAGE AND AGENT FOR REPAIRING CARTILAGE

Publication number: JP2002345455

Publication date: 2002-12-03

Inventor: KIMATA HIROHARU; SUGIURA NOBUO; MORIKAWA NORIYUKI; MORITA SHINICHIRO; HONDA MASAKI; UEDA MINORU; HATAKE KENICHIRO

Applicant: SEIKAGAKU KOGYO CO LTD; GUNZE KK; KIMATA HIROHARU; UEDA MINORU

Classification:

- **international:** **C12N5/06; A61L27/00; C12N5/06; A61L27/00;** (IPC1-7): C12N5/06; A61L27/00

- **European:**

Application number: JP20010154873 20010524

Priority number(s): JP20010154873 20010524

Report a data error here

Abstract of JP2002345455

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a base material for culturing cartilage exhibiting excellent promoting effects on histogenesis of a cartilage and an agent for repairing cartilage forming a cartilage capable of being transplanted to a living body. **SOLUTION:** The base material for culturing cartilage is obtained by combining a lipid-bonded glycosaminoglycan to a biologically absorbable porous material.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

JP2002345455

Title:

**BASE MATERIAL FOR CULTURING CARTILAGE AND AGENT FOR
REPAIRING CARTILAGE**

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a base material for culturing cartilage exhibiting excellent promoting effects on histogenesis of a cartilage and an agent for repairing cartilage forming a cartilage capable of being transplanted to a living body. **SOLUTION:** The base material for culturing cartilage is obtained by combining a lipid-bonded glycosaminoglycan to a biologically absorbable porous material.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-345455
(P2002-345455A)

(43) 公開日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 L 27/00	F 4 B 0 6 5
A 6 1 L 27/00		C 1 2 N 5/00	E 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2001-154873(P2001-154873)

(22) 出願日 平成13年5月24日 (2001.5.24)

(71) 出願人 000193524
生化学工業株式会社
東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(71) 出願人 000001339
グンゼ株式会社
京都府綾部市青野町膳所1番地

(71) 出願人 596025869
木全 弘治
愛知県名古屋市天白区植田山1丁目1404番地

(74) 代理人 100099852
弁理士 多田 公子 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨培養用基材及び軟骨修復材

(57) 【要約】

【課題】 優れた軟骨組織形成促進効果を示し、生体内に移植可能な軟骨を形成する。

【解決手段】 生体吸収性の多孔質に脂質結合グリコサミノグリカンを結合し、軟骨培養用基材とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂質とグリコサミノグリカンとが化学的に結合した脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬理的に許容される塩を担持する生体吸収性多孔質担体を含む軟骨培養用基材。

【請求項2】 脂質がリン脂質であることを特徴とする請求項1記載の軟骨培養用基材。

【請求項3】 コラーゲンを含むことを特徴とする請求項1又は2記載の軟骨培養用基材。

【請求項4】 請求項1記載の軟骨培養用基材と該基材上に保持された軟骨由来の細胞とから少なくともなる軟骨修復材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、軟骨細胞を培養するための軟骨培養用基材及び生体内への移植用の軟骨修復材に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、脂質結合グリコサミノグリカンとしては例えば特開平4-80201号、特開平4-80202号、特開平4-82836号及び特開平9-30979号に記載されたものが知られており、これらの物質は未分化な細胞の骨への分化を誘導することが知られている（特開2000-212204号）。

【0003】また、脂質結合グリコサミノグリカンやプロテオグリカンは基材などへの肝細胞等の接着を抑制する働きがあることが示唆されている（特開平5-236951号など）。

【0004】一方、軟骨細胞を培養し、軟骨を形成させるための様々な軟骨培養用の基材が探索されており、例えば生体分解性ポリマーやその多孔体を軟骨細胞の培養用基材として用いることが知られている（例えばW090/2091号、W098/31345号など）。これらの公知の軟骨培養用の基材も生体吸収性を有し、軟骨細胞の培養において一定の効果を示すため、生体に移植をすることが可能であるが、増殖効率などの点で更に改良の余地があり、現実に生体移植用の軟骨培養に使用されるまでには至っていない。

【0005】軟骨細胞を培養し、軟骨を作り出す技術及び軟骨の移植に対する社会的な要請は高く、従来得られている軟骨培養基材よりも、より軟骨細胞の増殖を促進し、優れた軟骨形成を可能とし、生体内に移植した際に生体内で分解・吸収されうる新たな軟骨培養用基材に対する期待が高まっている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、従来得られている軟骨培養基材よりも、より軟骨細胞の増殖を促進し、優れた軟骨形成を可能とし、生体内に移植した際に生体内で分解・吸収されうる新たな軟骨培養用基材を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは従来の軟骨培養基材より優れた軟骨組織形成効果を有し、また生体内に移植した際にも軟骨形成の継続が可能な軟骨培養用基材を鋭意探索した結果、脂質結合グリコサミノグリカンを生体吸収性の多孔質担体に担持させて得られる材料が優れた軟骨組織形成促進効果を示すことを発見し、本発明を完成させた。

【0008】すなわち本発明の要旨は以下の通りである。

【0009】本発明の第一の要旨は、脂質とグリコサミノグリカンとが化学的に結合した脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬理的に許容される塩を担持する生体吸収性多孔質担体を含む軟骨培養用基材である。当該軟骨培養用基材は、従来の軟骨培養用基材と比して更に高い軟骨組織形成促進効果を奏する。

【0010】本発明の第二の要旨は、上記軟骨培養用基材と、該基材上に保持された軟骨由来の細胞とから少なくともなる軟骨修復材である。本発明の軟骨培養用基材は生体吸収性を有し、優れた軟骨細胞増殖効果を奏するため、本発明の軟骨培養用基材上で軟骨由来の細胞を培養し、基材上に軟骨由来の細胞を保持させることにより得られた材料は、生体内に移植すると該生体内で軟骨形成を促進することが可能な代用軟骨としての役割を果たし得、軟骨形成を補助するための優れた軟骨修復材として有用である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳述する。

【0012】本発明の軟骨培養用基材は、脂質とグリコサミノグリカンとが化学的に結合した脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬理的に許容される塩を担持する生体吸収性多孔質担体を含むことを特徴とする。

【0013】＜脂質結合グリコサミノグリカン＞本発明に使用される脂質結合グリコサミノグリカンに含まれるグリコサミノグリカンは、D-グルコサミン又はD-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸、L-イズロン酸及び／又はD-ガラクトースの2糖の繰返し単位を基本骨格として構成される多糖であり、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的もしくは酵素的に合成されたもの等のいずれも使用することができる。具体的には例えばヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K等）、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸等が挙げられ、コンドロイチン硫酸、ヘパリン及びヒアルロン酸が好ましく、特にコンドロイチン硫酸が好ましいが、これらに限定されるものではない。

【0014】コンドロイチン硫酸は、一般に分子量約1、

000~100,000程度であるが、約2,000~80,000程度が好ましく、特に約3,000~70,000が好ましい。ヘパリンは一般に分子量約1,500~60,000程度であるが、約2,000~18,000程度が好ましく、特に約2,500~17,000が好ましい。また、ヒアルロン酸は一般に分子量約10,000~15,000,000程度であるが、約15,000~10,000,000程度が好ましく、特に約20,000~5,000,000が好ましい。尚、グリコサミノグリカンの分子量とは、通常平均分子量を意味し、一般的には極限粘度から算出される重量平均分子量を指称する。

【0015】また、上述のグリコサミノグリカンに結合させる脂質としては、動物、植物、微生物などの天然物由来、又は化学的もしくは酵素的に合成もしくは部分的に分解された複合脂質又は単純脂質を使用することができ、リン脂質等のグリセロ脂質、長鎖の脂肪酸、長鎖の脂肪族アミン、コレステロール類、スフィンゴ脂質、セラミド等いずれも使用することができる。特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルイノシトール等のリン脂質、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の中性脂質等のグリセロ脂質が好ましい。これらのうち、リン脂質が特に好ましい。

【0016】アシル基を有する脂質中のアシル基の鎖長及び不飽和度は特に限定されないが、炭素数6以上のものが好ましい。アシル基としては例えばパルミトイル（ヘキサデカノイル）又はステアロイル（オクタデカノイル）などが例示される。また、これらの脂質は通常使用される薬理的に許容される塩であってもよい。

【0017】グリコサミノグリカンの脂質との結合位置は特に限定されるものではないが、グリコサミノグリカンの末端部が好ましく、特に還元末端への結合が好ましい。また、結合の形態は特に限定されないが、特に化学結合が好ましく、その中でも共有結合による結合が最も好ましい。

【0018】グリコサミノグリカンと脂質とが共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンの場合、グリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基（ヘミアセタール基も含む）、水酸基もしくは1級アミノ基等の官能基、またはグリコサミノグリカンに別途導入された前記官能基と、脂質のカルボキシル基、ホルミル基もしくは1級アミノ基等の官能基、または脂質に別途導入された前記官能基との間で形成される酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）、エステル結合またはアミノアルキル結合（ $-CH_2-NH-$ ）によって共有結合したものが好ましい。

【0019】特に、グリコサミノグリカンの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラクトンを含

む）と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）、またはグリコサミノグリカンの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたグリコサミノグリカンのホルミル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された Schiff 塩基を還元して形成されたアミノアルキル結合（ $-CH_2-NH-$ ）により結合されたものが好ましい。

【0020】なお、上記共有結合に関与するアミノ基、カルボキシル基、ホルミル基（ヘミアセタール基を含む）、水酸基はグリコサミノグリカンまたは脂質に元来存在するもの、これらに化学的処理を施すことによって形成されたもの、あるいは上記官能基を末端に有するスベーパー化合物を、予めグリコサミノグリカンまたは脂質と反応させることによって別途導入されたもののいずれであってもよい。

【0021】特に好ましい脂質結合グリコサミノグリカンである、脂質がグリコサミノグリカンの還元末端に共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンの製造法としては、例えば特開平4-80201号、特開平4-80202号、特開平4-82836号及び特開平9-30979号に開示された方法が挙げられ、例えば以下のような方法が使用できる。

【0022】（還元末端限定酸化法）この方法は、グリコサミノグリカンの還元末端の糖残基であるガラクトース残基、ウロン酸残基またはヘキササミン残基を還元し、限定酸化（部分酸化）することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環（開裂）させるとともに、該グリコサミノグリカンの還元末端にホルミル基を形成させてアルデヒド化合物とし、このアルデヒド化合物のホルミル基と脂質の1級アミノ基とを反応させて Schiff 塩基を形成させ、次いで Schiff 塩基を還元し、アミノアルキル結合（ $-CH_2-NH-$ ）を形成させて、グリコサミノグリカンと脂質とを共有結合させる方法である。

【0023】グリコサミノグリカンの還元末端の糖残基の還元は、グリコサミノグリカンに対して5~50当量程度、好ましくは25~30当量の還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアン水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩等）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、ホウ酸塩緩衝液等）中、通常10~30℃、好ましくは15~25℃で行うことができる。

【0024】上記還元後、限定酸化を行ってグリコサミノグリカンの還元末端にホルミル基を有するアルデヒド化合物を製造する。限定酸化は、上記還元後のグリコサミノグリカンに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の酸化剤（過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム等の過ヨウ素酸アルカリ塩等）を用い、通常0~10℃、好ましくは0~4℃で行うことができる。

【0025】得られたアルデヒド化合物と1級アミノ基

を有する脂質（ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質等）とを反応させてシッフ塩基を形成させる反応は、水性溶媒（水、リン酸塩緩衝液等）または適当な有機溶媒（ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に上記アルデヒド化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒（クロロホルム、メタノール等）に脂質を溶解した溶液とを混合し、通常15～60℃の温度で反応させることができる。この反応時または反応終了後に適当な還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩等）を作用させてシッフ塩基を還元することができる。

【0026】なお、本反応方法で脂質結合グリコサミノグリカンを製造する際に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2価官能性のスペーサー化合物（例えば、エチレンジアミン等のアルキレンジアミン、またはリジン等のアミノ酸等）と上記アルデヒド化合物とを反応させて、アミノアルキル結合（ $-NH_2-NH-$ ）を形成させ、次いで上記スペーサー化合物の他方の官能基（例えばアミノ基）と反応し得る官能基（例えば、カルボキシル基）を有する脂質（例えば、モノアシルグリセロールコハク酸エステル等のモノアシルグリセロールジカルボン酸エステル）と反応させてもよい。

【0027】（還元末端ラクトン化法）この方法は、グリコサミノグリカンの還元末端の糖残基であるガラクトース残基、ウロン酸残基またはヘキササミン残基を酸化することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環（開裂）させて該グリコサミノグリカンの還元末端にカルボキシル基を形成させて、次いでラクトン形成反応に付すことによって該グリコサミノグリカンの還元末端をラクトン構造とし、このラクトンと脂質の1級アミノ基とを反応させて酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させることによって、グリコサミノグリカンと脂質とを共有結合させる方法である。

【0028】グリコサミノグリカンの還元末端の糖残基の酸化は、グリコサミノグリカンに対して2～20当量程度、好ましくは5～15当量程度の酸化剤（ヨウ素、臭素等）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、リン酸塩緩衝液等）中、通常0～40℃、好ましくは15～30℃で行うことができる。

【0029】上記酸化反応後、強酸性陽イオン交換樹脂、例えばダウエックス50（商品名；ダウケミカル社製）、アンバーライトIR-120（商品名；オルガノ社製）及び／または酸（塩酸、硫酸等の無機酸、または酢酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸の酸無水物）で処理することによって、グリコサミノグリカンの還元末端が特異的にラクトン化されたラクトン化合物を製造することができる。

【0030】得られたラクトン化合物と1級アミノ基を有する脂質（ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質）との反応は、適当な水性溶媒（水、リン酸塩緩衝

液等）または適当な有機溶媒（ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）にラクトン化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒（クロロホルム、メタノール等）に脂質を溶解した溶液とを混合し、5～80℃、好ましくは30～60℃の温度で反応させればよい。

【0031】なお、還元末端限定酸化法の場合と同様に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2価官能性のスペーサー化合物と上記ラクトン化合物とを反応させて酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させ、スペーサー化合物の他方の官能基と脂質の官能基（例えばカルボキシル基）とを反応させてもよい。

【0032】但し、脂質がグリコサミノグリカンの還元末端に共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンの製造方法はこれらの方法に限定されるものではなく、グリコサミノグリカンの還元末端に脂質を結合しうる方法であれば他の任意の方法によっても製造することができる。

【0033】グリコサミノグリカンの末端以外に脂質を導入する方法としては、例えばグリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と脂質の1級アミノ基とを反応させて、酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させる方法が挙げられる。

【0034】上記反応に際し、縮合剤（例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等）を用いて酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させるか、あるいはウロン酸部分のカルボキシル基を該縮合剤の存在下、活性化剤（例えば、N-ヒドロキスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール等）と反応させて活性エステルとした後、該脂質と反応させて酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させることができる。この様な方法により、一分子のグリコサミノグリカンに対して複数個の脂質を結合させることも可能である。

【0035】尚、上記反応においてはグリコサミノグリカンのウロン酸部分を有機溶媒に溶解可能な塩（トリエチルアミン、トリブチルアミン等のアミンの塩等）とし、反応を有機溶媒（ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン等）中で行うことが好ましい。

【0036】脂質結合グリコサミノグリカンの塩としては、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミン等のアミン塩；及びピリジン等の有機塩基との塩等が挙げられ、特に限定されないが、特に薬理的に許容されるアルカリ金属塩が好ましく、ナトリウム塩が最も好ましい。

【0037】上記のような脂質結合グリコサミノグリカンの具体例としては、ジパルミトイル-L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸、ジパルミトイル-L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸、ステアロイルパルミトイルホスファ

チジルセリン結合コンドロイチン硫酸、モノステアロイルグリセロール・コハク酸エステル結合コンドロイチン硫酸、ジパルミトイル-L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸、ジパルミトイル-L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン結合ヘパリン等が挙げられる。

【0038】<生体吸収性多孔質担体>本発明に使用される多孔質担体は、調製された多孔質担体に細胞を播種した場合、該細胞が多孔質担体表面または内部に付着・保持され、多孔質担体とともに培養された場合に細胞が増殖できるような多孔質形状を有し、生体に移植した際に軟骨が再生された後は分解・吸収される生体吸収性を有する多孔質担体である。さらに多孔質担体は、細胞を播種したときに代用軟骨として生体内に存在する軟骨と同様の適当な強度、弾性を有していることが好ましく、少なくとも、一定の形状を保持する程度の強度、弾性を有することがより好ましい。

【0039】本発明にいう多孔質形状とは、電子顕微鏡等により該担体を観察した際に、表面に多数の小孔が観察されると共に、該小孔が担体の内部に存在する空隙（ポア）と部分的に連通した構造を有しており、内部に培養液等の液体、軟骨細胞、脂質結合グリコサミノグリカン、グリコサミノグリカン、コラーゲン等の細胞外マトリックス等を担持することが可能な構造をいう。上記のような多孔質形状は、具体的にはスポンジ状、蜂の巣状又はそれらと同等なものが挙げられるが、好ましくはスポンジ状の形状を有するものである。

【0040】上記多孔質担体の表面の小孔及び内部の空隙の孔径は、細胞、好ましくは軟骨細胞を保持または担持できる構造であれば特に制限はされないが、通常10 μ m \sim 1mm、好ましくは50 \sim 300 μ m程度であり、また多孔質担体の密度は0.1 \sim 10g/cm³、好ましくは1 \sim 5g/cm³程度である。

【0041】本発明における生体吸収性とは、生体内に一定期間、例えば自家軟骨が再生されるまでの間、担体はその形状又は物性を保持し、その後分解・吸収されることで生体内への導入部分から消失しうる性質を指称する。本発明の生体吸収性多孔質担体としては上記脂質結合グリコサミノグリカンが担持された状態で一定期間経過後、生体内で分解・吸収される多孔質担体であれば特に限定はされないが、体内に埋植された場合には、1年以内、好ましくは6ヶ月以内に分解・吸収されるものが好ましい。

【0042】そのような性質を有する物質としては例えばグリコサミノグリカン、コラーゲン、ヒアルロン酸等の生体高分子物質又はその誘導体、乳酸、グリコール酸又はカプロラクトン等が単独重合又は共重合した合成高分子物質等があげられる。

【0043】例えば、上記多孔質担体は、合成の生体吸収性高分子である乳酸の重縮合体（ポリ乳酸）、グリコ

ール酸の重縮合体（ポリグリコール酸）、カプロラクトンの重縮合体（ポリカプロラクトン）、乳酸とグリコール酸との共重合体、グリコール酸とカプロラクトンとの共重合体、乳酸とカプロラクトンとの共重合体又は乳酸、グリコール酸及びカプロラクトンの共重合体のいずれかからなるものとして行うことができる。

【0044】上記共重合体は、ランダム共重合体又はブロック共重合体のいずれであってもよい。これらのブロック共重合体は、種々の長さの一連の鎖セグメントからなり、各セグメントはモノマーのホモポリマーからなるものであってもよく、あるいは二種以上の共重合体を含むランダム共重合体からなるものであってもよい。

【0045】これらの重合体はそれぞれ単独で用いてもよく、二種以上の混合物として用いてもよい。共重合体の構成モノマー比、二種以上の重合体の配合比は、上記のような性質を有する多孔質担体が得られる限り特に制限されない。

【0046】上記重合体はいずれも公知の方法により製造することができる。具体的には、例えば、本発明で好ましく用いることができる乳酸重縮合体（ポリ乳酸）は、光学活性を有するL体又はD体の乳酸から常法（C.E. Lowe, U. S. P. 2, 668, 162号）に従って乳酸の環状二量体であるラクチドを合成した後、そのラクチドを開環重合することによって得られるものである。重合は、一般に減圧下または不活性ガス雰囲気下において重合温度100 \sim 250 $^{\circ}$ Cで、スズ系、亜鉛系、アルミニウム系等の化合物を触媒として行うことができる。グリコール酸の重縮合体（ポリグリコール酸）、カプロラクトンの重縮合体（ポリカプロラクトン）なども常法に従って製造することができる。

【0047】本発明に用いられる生体吸収性多孔質担体の具体例としては、例えば乳酸、グリコール酸又はカプロラクトンなどの重合体または共重合体を用いて調製した多孔体（例えば特開2000-197693号、特開10-234844号など）、ヒアルロン酸の架橋体を主成分とするスポンジ（例えば特開平5-255124号など）、多糖類の溶液を凍結乾燥させることで得られるスポンジ（例えば特表2000-512666号、特開平11-276571など）、コラーゲンをを用いたスポンジ（Biomaterials 17 (1996) 155-162等）、コラーゲンと多糖類（グリコサミノグリカン、デキストラン、デキストラン硫酸またはアルギネート等）からなるマトリックス（W098/31345号）などがあげられ、いずれも好ましく使用することができる。その中でも特に乳酸及びカプロラクトンの共重合体を含む多孔質担体が好ましく、最も好ましくは、コラーゲンを含む乳酸とカプロラクトンとの共重合体が例示される。

【0048】これらの重合体の平均分子量は生体吸収性が得られる限り特に制限されないが、重量平均分子量で好ましくは1 \sim 50万、より好ましくは5 \sim 30万程度の範囲である。

【0049】本発明に使用される多孔質担体は、上記のような重合体の成形体から得られるが、上記の重合体の重合時、成形時、及び／または成型後に適当な処理をすることにより上記のような多孔質形状が得られる。そのような重合体の多孔質成形物を得る方法は公知であり、特に制限されるものではないが、例えば、上記重合体、共重合体などの重合体の溶液を所望の型枠に入れ、凍結後、真空凍結乾燥することによって所望の形態のスポンジ状などの多孔質成形体を得ることができる。あるいはそのような成形体から担体としての所望の形状をカットして本発明に使用される多孔質担体を得ることもできる。

【0050】本発明に使用される多孔質担体の強度は、軟骨培養用基材あるいは軟骨修復材として適当な強度であれば特に制限されないが、その引張破断強度は0.1kgf/cm²以上であることが好ましい。

【0051】本発明に使用される多孔質担体の形状は特に制限されず、目的に応じて適宜選択することができる。例えば耳介や鼻等、所望の軟骨再生対象物の形態を考慮して、それらの形に適合するように加工することができる。

【0052】また、本発明における多孔質担体は、更にその多孔質表面が細胞接着促進物質によって被覆されていてもよい。

【0053】細胞接着促進物質とは、細胞の接着を促進する性質を有するものであればよく、特に制限はないが、具体的にはコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン等が例示される。

【0054】被覆方法は特に制限されず、常法に従って行うことができるが、簡便には後述の実施例3（実験2）で示すように、多孔質担体を調製後、細胞接着促進物質に浸漬し、その後、再度凍結乾燥する物理的な結合方法の他、多孔質担体に存在するヒドロキシル基やカルボキシル基に細胞接着促進物質を公知の縮合剤などを用いて化学的に結合させる方法が例示される。なお、この細胞接着促進物質は、その分解・吸収特性を調節するために、更に架橋処理されていてもよい。その方法についても特に制限はないが、具体的には熱脱水法等が例示される。

【0055】＜軟骨培養用基材＞本発明の軟骨培養用基材は上記生体吸収性多孔質担体に脂質結合グリコサミノグリカンが担持された構造を有しているが、その担持の様式は特に限定はされない。すなわち、上記生体吸収性多孔質担体の材料自体が有する官能基、又は生体吸収性多孔質担体の材料に更に化学的に導入した官能基と、脂質結合グリコサミノグリカンが有する官能基又は脂質結合グリコサミノグリカンに更に化学的に導入した官能基とが化学的に結合されて担持されていてもよい。また、例えば脂質結合グリコサミノグリカンが溶解した溶液に生体吸収性多孔質担体を浸漬することで生体吸収性多孔

質担体に脂質結合グリコサミノグリカンを物理的に付着、吸着又は吸収させることで担持させてもよい。特に生体吸収性多孔質担体として疎水基を有する材料で調製した多孔質担体を使用する場合は、脂質結合グリコサミノグリカンに含まれる脂質部分と疎水結合させることで担持させることも可能である。

【0056】生体吸収性多孔質担体の調製時に、その原料と脂質結合グリコサミノグリカンを混合して生体吸収性多孔質担体を調製することで、本発明の軟骨培養用基材の表面以外に内部にまで脂質結合グリコサミノグリカンが担持させることも可能であるが、上述のように生体吸収性多孔質担体を脂質結合グリコサミノグリカンの溶液に浸漬することで該担体の表面のみに脂質結合グリコサミノグリカンを物理的な結合によって担持させることが可能であり、調製が簡単であり好ましい。

【0057】上記本発明の軟骨培養用基材は更に、軟骨の構成物質（例えばコンドロイチン硫酸、コラーゲン等の細胞外マトリックス、又はそれらの修飾物（例えば架橋物）など）をその表面、内部などに付着、吸着又は吸収させることにより含んでいてもよく、そのような構成物質は軟骨形成において軟骨細胞の足場としての生体吸収性担体の役割を助ける上で好ましい効果を奏する。そのような軟骨の構成物質を含む軟骨培養用基材は脂質結合グリコサミノグリカンが担持した生体吸収性多孔質担体を、上記構成物質を含む溶液に浸漬したり、あるいは生体吸収性多孔質担体を調製する際に予め原料に混合しておくことで容易に調製することが可能である。

【0058】本発明の軟骨培養用基材は軟骨由来の細胞の増殖を促進すると共に、生体内で分解され吸収される性質を有しているため、該基材上で培養された軟骨細胞との共存下において生体内への移植用の軟骨修復材として使用することが可能である。前記軟骨修復材は、本発明の軟骨培養用基材、本発明の軟骨培養用基材上に軟骨細胞を保持、例えば予め軟骨由来の細胞を数時間～数週間培養したもの、又は軟骨由来の細胞を本発明基材上に播種したものであり、当該軟骨修復材を生体内に移植することで優れた軟骨再生、及び補綴としての効果を奏する。上記軟骨由来の細胞は、哺乳類の軟骨由来の細胞であって移植対象の動物に対して重篤な抗原性を示さないものであれば利用可能であり、当該軟骨修復材を移植する対象の生物種により適宜選択される。当然のことであるが、抗原性などの生体防御機構の問題から、移植の対象の生物種と生物系統学的に同一又は類似する生物の軟骨由来の細胞を選択することが好ましい。このような軟骨由来の細胞は、公知の方法によって得ることができる。すなわち、採取した軟骨をコラーゲナーゼなどの酵素で分解して細胞を取り出す方法、又は採取した軟骨片をそのまま培養し、軟骨片から出てきた細胞を採取する方法が挙げられる。

【0059】また、本発明の軟骨修復材は更にヘッジホ

グ・タンパク質 (ソニック (Shh)、インディアン (Ihh)、デザート (Dhh) ; Kintoら、FEBS Letters 404(1997)319-323) またはBMP (bone morphogenetic protein) を含んでいてもよく、このようなタンパク質を含むことで生体内において本発明の軟骨修復材が移植された周辺域での軟骨形成を助長することが可能である。尚、BMPは、骨、軟骨、腱、および骨中に存在する分子であり、特にBMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-7は軟骨形成および骨形成を同時に開始させる。このため、軟骨組織の修復に関しては、同時に骨を誘導することなく、軟骨形成の開始を達成することが有利であり、BMPの骨形成性を阻害するBMPアンタゴニスト (例えば、ノギン (noggin : Re'em-Kalmaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(1995)12141-12145)、コージン (chordin : Sasaiら、Cell 79(1994)779-790)、またはフォリスタチン (follistatin : Nakamuraら、Science 247(1990)836-838)) も同時に本発明の軟骨修復材に含ませておくことが好ましい。これらのタンパク質は、例えば生体吸収性多孔質担体の調製に際し、材料に混合しておくこと又は生体吸収性多孔質担体をこれらのタンパク質の溶液に浸漬することで、軟骨修復材に含ませることが可能である。

【0060】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0061】実施例1

軟骨培養用基材の調製

常法に従って調製した乳酸／カプロラクトン共重合体 (75:25) 2gを100mlのジオキサンに加え、40℃で攪拌した。これをガラス製型枠に流延し、-12℃の冷凍庫に入れ、1時間凍結させた後、40℃で24時間真空凍結乾燥を行った。このようにして作成した厚さ2 mmのスポンジ (基材1) をφ9 mmに切り出し、24穴マルチプレート内に置いたセルカルチャーインサート (ケモタキセル、φ9 mm、膜孔径8.0μm) 内に設置した。これをエチレンオキサイドガス (以下「EOG」とも記載する) 滅菌 (60℃、1時間) し、その後、60℃で5日間、真空状態に保って残留EOGを除去して滅菌担体を得た。

【0062】特開平4-80201の実施例1に記載された方法により製造された、L-(α-ホスファチジル)エタノールアミン・ジパルミトイルをそれぞれ還元末端に結合した、平均分子量23,000のヒアルロン酸 (鶏冠由来：以下「HA-PE」と略記する)、平均分子量20,000のコンドロイチン硫酸C (サメ軟骨由来：以下「CS-PE」と略記する) 及び平均分子量10,000のヘパリン (ブタ小腸由来：以下「Hep-PE」と略記する) (以下、これらを総括して「GAG-PE」とも略記する) をそれぞれ1.0mg/mlとなるようにリン酸緩衝生理食塩水 (以下「PBS」と略記する) に溶解させた。この溶液をそれぞれ遠心ろ過滅菌し、HA-PE溶液、CS-PE溶液、及びHep-PE溶液を得た。

【0063】上記滅菌担体を70%エタノール水溶液で洗浄して親水化した後、PBSで3回洗浄し、HA-PE溶液、CS-PE溶液又はHep-PE溶液を56.3μl添加した。これを4℃で16時間放置し、その後PBSで3回洗浄した。その後更に10%の牛胎仔血清 (以下「FBS」と略記する) を含むダルベッコの調整イーグル培地 (以下「DMEM」と記載する：ギブコ社製) で1回洗浄し、軟骨培養用基材を調製した。以下、このように調製された担体 (軟骨培養用基材) を、それぞれHA-PE担体、CS-PE担体、及びHep-PE担体と記載する。

【0064】実施例2

軟骨細胞の採取と播種

Lewis系4週齢雄性ラット4匹から以下の方法により軟骨細胞を採取した。すなわち、肋骨軟骨を摘出し、それを5mm程度に細切した。その後0.1%エチレンジアミン四酢酸 (以下「EDTA」と記載する：ナカライテスク社製) /PBS(-) (ローマン工業社製) に37℃で20分間浸漬し、更に37℃で1時間0.25%のトリプシン (ギブコ社製) を含む0.1%EDTA/PBSに浸漬した。このトリプシン処理軟骨片をPBSで3回洗浄し、37℃で3時間0.1%コラゲナーゼ (和光純薬工業株式会社製) /PBS(+) に浸漬した後、PBSで洗浄した。このようにして得られた軟骨細胞をφ10cmの細胞培養用ディッシュ20枚上に静置し10%FBSを含むDMEMを培地として3週間培養した。

【0065】培養した軟骨細胞をPBSで洗浄し、37℃で10分間0.25%トリプシンを含む0.1%EDTA/PBSに浸漬した後、細胞を回収した。コウルターカウンタによる細胞数の計数の結果、培養後の細胞数は 5.66×10^6 個であることがわかった。

【0066】これらの細胞を 1.14×10^6 個/mLとなるように10%FBSを含むDMEM培地に分散させ、ケモタキセルの各HA-PE担体、CS-PE担体、及びHep-PE担体上に、400μlずつ添加して播種した。高密度培養による培地中の栄養分の減少を防ぐため、ケモタキセル外に培地を1.2ml添加し、37℃の5%インキュベータ内で9日間培養し、培養された軟骨細胞を保持した軟骨修復材 (以下、それぞれHA-PE材、CS-PE材、Hep-PE材といい、またこれらを総称してGAG-PE材という) を得た。

【0067】実施例3

マウスへの移植と組織観察

(実験1) 実施例2で得た各軟骨修復材 (HA-PE材、CS-PE材、及びHep-PE材) をヌードマウス (KSN-nuSlc : 日本エスエルシー) 12匹 (HA-PE材、CS-PE材、Hep-PE材、及び対照群各3匹ずつ) の背部皮下に1匹あたり2個ずつ移植した。4週間後、マウスを安楽死させ、移植したHA-PE材、CS-PE材、及びHep-PE材をそれぞれ摘出し、常法に従ってホルマリンで固定し、パラフィン包埋薄切片を作成した。このように作成した切片をヘマトキシリン・エオジン染色及びアルシアンブルー (pH1.0) 染色を行い、光学顕微鏡下で固有組織像を観察した。

【0068】アルシアンブルーは軟骨組織を染色するため、アルシアンブルーによって染色された陽性部分が認められた切片は軟骨組織が形成されたと判定した（表1：実験1）。

【0069】また、軟骨組織が形成されたと判定された対照群の個体の固有組織像と、GAG-PE材を用いて軟骨組織が形成されたと判定された個体の固有組織像を比較すると、GAG-PE材を使用した固有組織像において、アルシアンブルーにより染色された面積が広い傾向が観察された（図1及び図2）。

【0070】（実験2）0.15%コラーゲン溶液（I型、ブタ腱由来、pH3.0、新田ゼラチン株式会社製）を実施例1で作成した基材1に十分浸漬させ、-30℃にて1時間凍結させた後、真空凍結乾燥した。このようにして作成したものを120℃、真空下にて24時間、熱脱水架橋処理に付した。このようにして得た基材を用いて実験1と同様の実験を行った結果、実験1ではほとんど効果が見られなかったHA-PEを用いた場合においても軟骨の形成が観察された（表1：実験2）。

【0071】尚、軟骨細胞の増殖性は、採取した際の細胞の状態が大きく反映されるため、軟骨組織形成に影響を与えるが、GAG-PEを使用しなかった対照と比して、GAG-PEを使用した個体で軟骨組織形成促進傾向が観察され

た。

【0072】

【表1】

	GAG-PE	軟骨組織形成個体数
実験1	CS-PE	2
	Hep-PE	1
	HA-PE	0
	対照	1
実験2	CS-PE	3
	Hep-PE	2
	HA-PE	2
	対照	1

【0073】

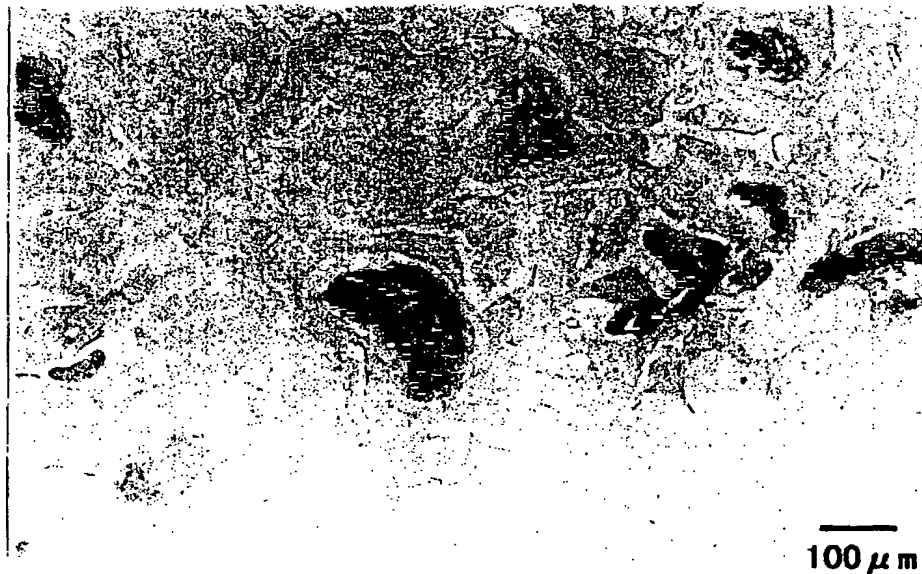
【発明の効果】本発明により、脂質結合グリコサミノグリカンが担持された新たな軟骨培養用基材が提供され、生体に導入可能な培養軟骨の調製が可能となる。

【図面の簡単な説明】

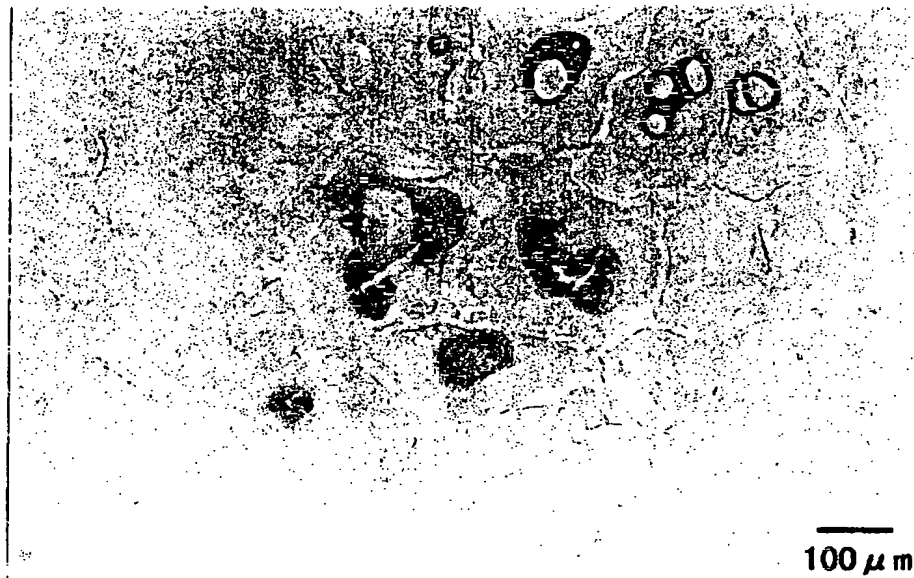
【図1】 CS-PEを使用した実験1において移植後に生じた組織をアルシアンブルーにより染色した組織を示す図面に代わる写真である。

【図2】 GAG-PEを使用しなかった実験1において移植後に生じた組織をアルシアンブルーにより染色した組織を示す図面に代わる写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

- | | | | |
|---------|--|----------|---|
| (71)出願人 | 598167040
上田 実
愛知県日進市岩崎台 2-415 | (72)発明者 | 森田 真一郎
京都府綾部市井倉新町石風呂 1 番地グンゼ
株式会社京都研究所内 |
| (72)発明者 | 木全 弘治
愛知県名古屋市天白区植田山 1 丁目1404番
地 | (72)発明者 | 本田 雅規
愛知県大府市東新町 5 丁目55番地 |
| (72)発明者 | 杉浦 信夫
岐阜県羽島郡岐南町石原瀬 1 丁目43の 5 | (72)発明者 | 上田 実
愛知県日進市岩崎台 2-415- 1 |
| (72)発明者 | 森川 訓行
京都府綾部市井倉新町石風呂 1 番地グンゼ
株式会社京都研究所内 | (72)発明者 | 畠 賢一郎
愛知県刈谷市板倉町 2-10- 3 サンビレ
ッジ板倉102 |
| | | Fターム(参考) | 4B065 AA93X BC42 CA44
4C081 AB04 BA13 CD141 CD35
EA13 |